

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文審査報告書

論文題目

Action mechanism of lithium on a mammalian
circadian rhythm

ほ乳類体内時計に対するリチウムの作用機序解明

申請者

氏 名

岩花 永以子

Eiko Iwahana

専攻・研究指導
(課程内のみ)

電気・情報生命専攻

神経薬理学研究

2007 年 7 月

我々は通常、1日24時間の明暗周期の外界環境に合わせて生活しているが、これは我々の体内に存在する時計が、24時間という外界の周期に正確に適応させているためである。体内時計の働きによる概日時計は、生物に普遍的に存在する機能で、生物が地球上の24時間周期に適応した生命現象の一つである。体内時計は約24時間周期で発振すること、そして外界の周期的環境に自らの時計を同調させる機能がある。しかし、その機能には、適応可能な範囲があり、 24 ± 4 時間以上の周期的変動には我々の体は適応できず、この範囲を超えると、生体のホメオスタシスを保つことは難しくなる。ヒトにおいてこのような状態が長く続くと心身の不調を伴い、うつ病や自律神経疾患から体内時計が関与すると考えられている循環器系疾患である心臓病や糖尿病などさまざまな疾患を引き起こす可能性がある。本研究では、体内時計の外界環境への適応機構を明らかにする目的で、以下の3つの研究を行った。実験1、時計遺伝子変異マウスが、どのような周期的外界環境下にその体内リズムを適応できるかを明らかにするため、20時間から32時間までの明暗周期変動環境下で、その行動リズムを比較検討した。実験2、臨床上躁鬱病の治療薬に用いられているリチウムが、体内時計の周期を延長する作用を持つことを利用し、体内時計の周期が延長する時に、どのようなメカニズムが関与しているかを検討した。実験3、実験2の結果から、老化と長周期外界環境への適応機構との関連を検討した。

実験1：自律的に概日リズムの発振を行う視交叉上核（SCN: suprachiasmatic nucleus）では、多くの時計遺伝子の周期的な発現が厳密に制御されている。その一つであるCLOCK蛋白の転写活性化ドメインが変異した、*Clock*変異マウスは、生体内のSCN以外の各組織での遺伝子発現リズム、行動リズムに異常を示すことが報告されている。本研究では、*Clock*変異マウスの体内時計が、正常マウスより約4時間長い、約28時間周期であることを明らかにし、さらに、正常マウスでは不可能な1日28時間、32時間の明暗周期環境下にも適応できることを、体温リズム、および行動リズムから明らかにした。そして、*Clock*変異マウスのSCNは恒暗条件下において、自律的に概日リズムを発振し、その発振周期は、長周期であることを明らかにした。28時間周期の明暗条件下では、SCN内の時計遺伝子である*mPer2*の発現リズムの振幅が、24時間周期の場合と比較して約2倍に上昇した。本研究結果は、*Clock*変異マウスのSCNでは*mPer1*、*mPer2*を介した発振機構が長周期下において、より機能することを意味する。そして、*Clock*変異マウスは時計遺伝子の変異により、24時間より長い周期的環境下にも、生体リズムを適応可能にすることを示唆する。

実験2：次に、体内時計の周期が変わる機構に、どのような細胞内情報伝達機構が関連しているのかを明らかにするため、薬物投与による一過性の周期延長下においての機構解明に臨んだ。躁鬱病薬として良く知られているリチウムをマウスに投与し、その行動リズムを延長させ、SCNで起こる変化と、

その作用機構を追究した。リチウムは、躁鬱病の治療薬として古くから使用されており、リズムに対しては、行動リズムの周期を延長させる効果を持つことが報告されている。躁鬱病患者の症状として、体温や睡眠・覚醒のリズムに異常があることが報告されていることから、リチウムが体内時計にも影響し、躁鬱病への治療効果を示していることも考えられるが、その詳細な作用機序については、未だ明らかとされていない。グリコーゲン合成酵素-3 (GSK-3) は、グリコーゲン代謝をコントロールする酵素として、発見されたセリン/スレオニン・キナーゼである。セリン9とセリン21でリン酸化されることによって、不活性化する数少ない酵素の一つである。そして、近年、このリチウムが GSK-3 の活性を直接阻害することが、*in vitro* の実験で報告された。また、GSK-3 のオーソログである、*shaggy* (SGG) を過剰発現させたショウジョウバエでは、短周期になることが報告されていることから、リチウムによる行動リズム周期延長作用は、GSK-3 と直接関係しているのではないかと考え、以下の実験を行った。

マウス (6-8 週令) の行動を恒暗条件のもと、赤外線センサー下で行動をモニターし、約 2 週間後にリチウム (LiCO_3) が混餌した飼料を半数のマウスに与えた結果、リチウムを摂取したマウスの行動リズムは、1 日約 28 時間で活動するようになった。また、24 時間の明暗周期下にてリチウム投与されたマウスは、周期延長作用のため、活動リズムが遅れてしまうという、位相後退作用が確認された。このことはリチウムが体内時計の発振源である SCN に直接作用し、効果を出現していることを示唆する。次に、*in situ* hybridization 法を用いて、GSK-3 遺伝子の発現部位を特定したところ、SCN に高発現していることが確認された。そこで、免疫染色法を用いて、SCN 内の、GSK-3 タンパク質の発現を観察した結果、リチウムが SCN 内の GSK-3 の発現に有意に影響していることが明らかとなった。また、脳の他の部位、弓状核 (ARC: Arcuate Nucleus) にも GSK-3 は高発現しているが、リチウムによる影響は全く見られないことから、SCN の特異性が指摘できた。興味深いことに、SCN 内では、トータル GSK-3 とそのリン酸化型である pGSK-3 が、逆位相のサーカディアンリズムで発現していた。そして、リチウムにより、行動リズムが延長されたマウスの SCN では、pGSK-3 が高発現し、逆に、トータル GSK-3 の発現は低くなっていた。SCN 特異的な本現象は、リチウムが GSK-3 の活性を抑制することにより、SCN の神経活動リズムの周期が延長し、結果、行動リズムをも延長させたことが示唆される。以上より、リチウムによる一過性の体内時計の周期延長機構には、GSK-3 の制御機構が直接関与していることが明白となった。

実験 3 : 次に、以上 2 つの実験の結果をもとに、老化におけるリチウムの周期延長作用と GSK-3 の関連について検討した。近年の研究から、アルツハイマー病と GSK-3 の機能との深い関連性が報告されている。GSK-3 は、アルツハイマー病の主要構成成分である、*tau* タンパク質をリン酸化し、アル

ツハイマー病を進行させる。さらに、リチウムは、GSK-3 を抑制し、さらには、アミロイド β 前駆体タンパク質である APP からのアミロイド β の切断・生成を抑制する作用が報告されている。また、ハムスターは、老齢になるにつれ、周期が短くなることから、本研究では、リチウムと GSK-3 の関係が、体内時計にだけでなく、老化やそれに伴う疾病について、重要な役割を果たすのではないかと考え、週令差のあるハムスターを用いて、リチウムの作用効果について検討した。4 週齢、3 ヶ月齢 (Young)、そして 18 ヶ月齢 (Old) のハムスターの輪まわし行動を恒暗条件下にてモニターし、約 2 週間後にリチウム (LiCO_3) を混餌した飼料を与えたところ、Young ハムスターには、リチウムによる周期延長がみられたが、Old ハムスターにおいては、周期は延長しなかった。そこで、SCN 内の GSK-3 について詳しく調べた結果、Young における、pGSK-3 タンパクの発現は、ピークタイム (点灯 2 時間後) をもって、リズム発現していた。これは、以前のマウスの研究結果とほぼ同じである。また、トータル GSK-3 の発現量は、Young、Old 共に低く、差はなかったので、本実験において pGSK-3 を比較検討のマーカーとした。pGSK-3 は、その発現ピークタイムにおいて、Old の発現量が有意に低かった。このことは、Old の方が、本作用においてのリチウムのターゲットとなるトータル GSK-3 が少なく、そのため、リチウムによる周期延長作用が見られないことを示唆する。本結果は、GSK-3 の発現、およびリン酸化が年齢依存的な支配を受け、老齢動物では pGSK-3 の発現量が低いため、リチウムの体内時計の周期延長効果が現れなかったと考えられる。

以上の研究結果は、躁鬱病の治療薬として実際に臨床現場で汎用されているリチウムが、体内時計のある SCN に直接作用すること、そして、GSK-3 タンパク質をリン酸化することで、そのタンパク質を不活性化し、体内時計の周期を遅らせることを明らかとした、世界初の報告である。さらに、体内時計の発振源である、SCN の時計遺伝子の発現周期を延長させることで、生体リズムは、より長周期の外界環境にも適応することができ、リチウムは、それを可能にする薬物であることを明瞭にした。そして、精神疾患に使用する薬物が、体内時計を薬物ターゲットとして機能する可能性を初めて示した点で、画期的な研究結果と評価する。時差ぼけ、睡眠リズム障害などリズム性の疾患を治療する薬物が現存しない状況で、今回示した研究の戦略が応用され、新規のリズム治療薬の創薬、発展に貢献できることを期待する。このような観点から、本論文は博士 (理学) の学位論文として評価できると判断した。

2007 年 7 月

審査員

(主査) 早稲田大学教授
早稲田大学准教授
早稲田大学准教授

薬学博士 (九州大学)
博士 (学術) (埼玉大学)
博士 (理学) (京都大学)

柴田 重信
胡桃坂仁志
岡野 俊行